

新規ジーンターゲットングシステムによる ARIP1/S-SCAM遺伝子欠損マウスの作製と解析

著者	伊原 孝一郎
号	45
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第957号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60250

いはら かんいちろう

氏 名（本 籍 地） 伊 原 寛一郎

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 957 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 21 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 新規ジーンターゲットイングシステムによる ARIP1/S-SCAM 遺伝子欠損マウスの作製と解析

博士論文審査委員 （主査）教 授 西 森 克 彦

教 授 佐 藤 英 明

准教授 福 田 智 一

論文内容要旨

第一章 序論

TGF- β スーパーファミリーに属するアクチビン β は、脳下垂体からの FSH (follicle stimulating hormone; 卵胞刺激ホルモン) の分泌を促進する因子として発見され、その後、生殖機能以外にも幅広い生体制御機構に関与していることが報告されている。

Activin receptor-interacting protein1 (ARIP1) は、徳島大学の研究グループにより、マウス脳の cDNA ライブラリーを用いた two-hybrid screening によって ActRIIA に結合するタンパク質として同定された。ARIP1 には 2 つの isoform があり、N 末端側から PDZ ドメイン、Guk ドメイン、2 つの WW ドメイン、5 つの PDZ ドメインをもつ ARIP1-long、ARIP1-long のオルタナティブスプライシングによって生じ、Guk ドメインの途中から N 末端側を欠く ARIP1-short の 2 つが知られている。ARIP1 は、その 5 番目の PDZ domain によって ActRIIA の C 末端にある PDZ-binding motif と、WW domain によって Smad3 と結合することが報告されている。ARIP1 はアクチビンシグナルを負に制御することが報告されているが、そのメカニズムは未知である。

また、東京医科歯科大学の研究グループにより、ARIP1 と同一の分子として Synaptic scaffolding molecule (S-SCAM) が報告されている。S-SCAM は yeast two-hybrid screening によって、シナプスに存在する SAPAP に結合するタンパク質として同定され、その後、NMDA 受容体や neuroligin などのシナプス膜上に存在するタンパク質とも結合すること、興奮性のシナプスだけでなく、抑制性のシナプスの一部にも存在することが明らかとなっている。ARIP1/S-SCAM KO マウスに関しては、東京医科歯科大学の研究グループにより、最も N 末端までを含むサブタイプのみを欠損させたマウスが新生児致死の表現型を示し、スパインと呼ばれる神経細胞の樹状突起上にある棘の長さが異常に伸びていることが示された。スパインはシナプスからの情報を受け取り、学習や記憶に関与すると考えられている。

一方で、アクチビンと脳の高次機能を結び付ける報告はさほど多くない。脳の急性の損傷によってアクチビン β A の mRNA が急激に上昇すること、*in vitro* において外在性のアクチビンが神経細胞の保護に働くことなどが知られていたが、前脳においてドミナントネガティブ型 ActRIB を過剰発現させたトランスジェニックマウスの解析により、このマウスの神経細胞は、神経毒に対してよ

り脆弱であり、さらには通常状態においてもグルタミン酸作動性の神経伝達も低下することが示された。スパインに関しては、ラット海馬の急性スライスを用いた実験で、アクチビンを作用させるとスパインの密度が増加することが報告されている。また、ARIP1 がチロシンリン酸化酵素である Fyn と結合し、アクチビン刺激による NMDA 受容体からの Ca^{2+} イオンの流入を促進することや、フォリスタチンのトランスジェニックマウスを用いた研究から、アクチビンと不安行動との関連が指摘されている。

本研究は、ARIP1 の生体内での機能解明を目指し、新規ジーンターゲットシステム構築と、それを用いた ARIP1/S-SCAM(以下 ARIP1) 遺伝子欠損マウス(KO マウス)の作製・解析を行うことを目的とした。

第二章 *In vitro* における ARIP1/S-SCAM のドメイン機能の解析

ARIP1 の細胞内における機能を推測するため、ARIP1 と Venus の融合タンパク質発現ベクターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションして一過性に発現させ、その細胞内における局在を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。その結果、ARIP1 は特に細胞膜上において、強い発現が確認された(Fig.1A)。

ARIP1 の構造がアクチビンシグナルに及ぼす影響を調べるため、ルシフェラーゼアッセイを行った。トランスフェクションにはアクチビン応答性の配列をルシフェラーゼ遺伝子に結合した p3TP-lux と呼ばれるベクター、ARIP1 発現ベクター及びトランスフェクション効率の補正のための β -ガラクトシダーゼ発現ベクターである pCH110 を用いた。野生型の ARIP1 を CHO 細胞にトランスフェクションしたところ、予想通りアクチビンシグナルを抑制するという結果になった(Fig.3)。

そこで ARIP1 の PDZ ドメインに着目し、アクチビン受容体と結合することが知られる 5 番目の PDZ ドメインを欠損させた ARIP1 (Δ PDZ5) を作製し(Fig.2)、細胞内における局在を観察した(これ以降は全て CHO 細胞を用いている)。その結果、ARIP1 (Δ PDZ5) は細胞膜上のみならず、細胞質においても広く観察された(Fig.1B)。この ARIP1 (Δ PDZ5) がアクチビンシグナルに及ぼす影響を調べるために、ルシフェラーゼアッセイも同時に行ったが、ルシフェラーゼ活性は抑制されたままであった(Fig.3)。

そこで次に、Smad3と結合することが分かっているWWドメインに着目した。WWドメインがアクチビンシグナルの抑制に関与している可能性を考え、WWドメインを欠損させた ARIP1 (Δ WW) を作製し(Fig.2)、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ARIP1 (Δ WW) を用いた場合においてもアクチビンシグナルは抑制されたままであった(Fig.3)。

次に、細胞内シグナル伝達因子の Smad3 に着目し、その動向に注目した。FLAG タグを付加した Smad3 発現ベクターのみ、あるいは ARIP1 発現ベクターと共にトランスフェクションした時の Smad3 の細胞内における局在を観察した。その結果、Smad3 を単独で発現させたものは多くの細胞で核における局在が観察されたのに対して、ARIP1 と共に発現させた時は、核においてその局在を観察することができず、ARIP1 が Smad3 の核移行を阻害していることが明らかとなった(Fig.1C)。

そこで ARIP1(Δ WW)を用いて同様の観察を行った。このベクターを Smad3 発現ベクターと共にトランスフェクションして Smad3 の細胞内における局在を観察したところ、野生型 ARIP1 と同様に核における Smad3 の局在は観察することができなかった(Fig.3C)。このことにより ARIP1 の WW ドメイン以外の領域が、Smad3 の核移行阻害に関与していることが明らかとなった。

第三章 ARIP1/S-SCAM 遺伝子欠損マウスの作製

ARIP1 の生体内での機能の解明を目的とし ARIP1 遺伝子欠損マウスの作製に着手すると同時に、新規ジーンターゲティングシステムの構築を目指した。ARIP1 はゲノム全長が約 150 万 bp、22exon からなる巨大な遺伝子であり、その全部を一度に欠損させることは困難であった。そこで exon6 から最終 exon である exon22 までをつないだ cDNA と stop sequence を loxP 配列で挟み、下流側の loxP 配列の後ろに蛍光タンパク質の Venus を組み込んだコンストラクトを作製、ARIP1 exon6 の locus に組み込んだ(Fig.4)。このシステムでは、floxed の状態では野生型と同様に ARIP1 が発現するが、stop sequence が働き、下流の Venus は発現しない。しかし、Cre recombinase により loxP に挟まれた領域を欠損させると Venus が発現して、ARIP1 の発現部位が容易に可視化できるシステムとなっている。

ターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により、129Ola 由来のマウス ES 細胞(Embryonic stem cell; 胚性幹細胞)である E14TG2a へ導入した。薬剤選択、サザンブロットによる解析を行い、正しく相同組み換えを起こした ES クローンを 17 クローン得た(Fig.5A)。このうち 9 クローンを C57BL/6J マウス 3.5 日胚にマイクロインジェクションし、12 匹のキメラマウスを得た。このうち 8 匹に関して試し交配を行ったところ、3 匹の生殖細胞系列に ES 細胞が寄与していることが分かった。よってこの 3 匹のキメラマウスを今後の解析のために用いることにした。

胚発生の初期から全身で Cre recombinase を発現する、CAG-Cre トランスジェニックマウスとキメラマウスの交配によって、loxP に挟まれた領域が組み換えによって欠損したマウス(ARIP1^{+/+})を取得し、ARIP1^{+/+}同士の交配によってホモノックアウトマウス(ARIP1^{-/-})の取得を試みた(Fig.5B)。ARIP1^{+/+}同士の掛け合わせから産まれた ARIP1^{-/-}はメンデルの法則に従って出生し、外見上も全く正常で、呼吸や哺乳も正常に行っていたが、出生後 3 日以内に全て死亡するという新生児致死の表現型を示した(Table1)。そこで、新生児致死となる原因について解析を行った。

出生当日(P0; postnatal day 0)のマウスについて、発育遅延や発生段階における臓器形成に異常がないかどうかを調べるため、体重測定・臓器重測定を行った。その結果、体重、腎臓、心臓、脳では遺伝子型による差は認められなかった(Fig.6)。新生児致死となる KO マウスの例としては、口蓋裂や動脈管開存症が報告されており、それらの症状を示していないかどうか解析を行った。その結果、ARIP1^{-/-}はどちらの症状も示していないことが分かった(Fig.7)。しかし胸部の切片を解析しているうちに、ARIP1^{-/-}の肺で異常が見られる個体が観察された。ARIP1^{+/+}では肺胞に空気が入って広がっていたが、ARIP1^{-/-}では肺胞が潰れ気味で、肺胞に血がたまっている箇所も見受けられた(Fig.8A)。この肺の障害が出生後に起きたのか、それとも出生前の肺の形成段階で起きたのかを確かめるため、出生直前の胎生 19.0 日目(E19.0)のマウスを用いて解析した。P0 と同様に胸部切片の観察を行ったが、構造に異常は見られなかった(Fig.8B)。よって肺の異常は出生後に起きているものであり、直接の原因は解明するに至らなかったものの、何らかに異常が生じた結果、肺の異常が起こり、新生児致死に至ったと思われる。

第四章 ARIP1/S-SCAM 遺伝子生殖器官特異的 KO マウスの作製と解析

アクチビンは生殖機能に大きく関与しているため、ARIP1 の生殖器官特異的 KO マウスを作製し、解析を行った。TGF- β スーパーファミリーに属する、Amhr2(Anti-mullerian hormone type 2 receptor; 抗ミュラー管ホルモン 2 型受容体)の locus に Cre をノックインした Amhr2-Cre は、成獣雄では精巢のセルトリ細胞やライディッヒ細胞で、成獣雌では卵巣の顆粒膜細胞で Cre を発現していることが報告されている。そこで、Amhr2-Cre マウスを用いた生殖器官特異的 KO を行い、ARIP1 の生殖機能への関与の解明を試みた。

作製した Amhr2-Cre KO マウス (ARIP1^{-/-}; Amhr2-Cre^{+/+}) は、コンベンショナル型 KO で見られた新生児致死を回避して、性成熟を満たす週齢まで生き延びた。よってこの Amhr2-Cre KO マウスを、生殖機能の解析に用いることにした。

まず雄について、精巢及び精巢上体の切片を HE 染色し、構造を観察した。しかし、精巢の形態に異常は認められず、精巢上体にも精子が詰まっているのが観察された (Fig.9A-D)。この雄が生殖能力があるかどうかを確かめるため、C57BL/6J 雌マウスとの交配試験を行った。その結果、KO マウスはコントロールとの間で、掛け合わせた雌の妊娠率や、その雌の平均仔産数に差は認められなかった (Table2)。よって、Amhr2-Cre KO マウスの雄は、正常な生殖能力を持つとの結論に至った。

雌についても、卵巣の切片を HE 染色し、構造を観察した。しかし KO マウスで形態的な異常は認められなかった (Fig.9E, F)。また、C57BL/6J 雄マウスとの交配試験を行ったが、KO マウスは正常に妊娠、出産し、コントロールとの間で平均仔産数や、出生 1 日後の新生児の生存率には差は認められなかった (Table3)。よって、Amhr2-Cre KO マウスの雌は、正常な生殖能力を持つとの結論に至った。Amhr2-Cre を用いた生殖器官特異的 KO マウスは、雄・雌共に正常な生殖能力を有しており、Amhr2-Cre の働く体細胞由来の生殖器官細胞においては、ARIP1 は死活的機能を果たしていないものと推定した。

第五章 ARIP1/S-SCAM 遺伝子の発現解析

ARIP1 の発現組織の特異性を明らかにするため、C57BL/6J 成獣マウスの臓器・組織より RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、ARIP1 及びアクチビンシグナルに関連する Smad2,3,4、ActRll は幅広い組織で発現していることが分かった(Fig.10A)。続いて主要な臓器・組織においてノーザンブロットを行い、発現している臓器とその発現量を確認した。ARIP1 は脳で最も強い発現が見られ、バンドも 7.5kb、6.3kb の二つが確認された。他にも、腎臓と精巣で中程度の発現が、心臓、卵巣でもわずかに発現が確認された(Fig.10B)。

本システムでは、ARIP1 遺伝子の発現を Venus の蛍光で知ることができるように構築したが、そのシステムの確認を、最も発現の強かった脳で行うことにした。まず、ARIP1^{-/-}で脳の形態に異常がないかを cresyl violet 染色によって確認したが、P0 の脳では構造的な異常は観察されなかった(Fig.11)。そこで P0 マウスの脳を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により Venus 蛍光の観察を行った。両アレルが floxed のマウス(ARIP1^{flx/flx})では、ARIP1^{+/+}と同様に蛍光が観察されず、stop sequence によって転写が停止し、下流に挿入した Venus は発現していないと思われた(Fig.12)。一方、ARIP1^{-/-}の脳では強い Venus 蛍光が観察され、ノックアウト時に Venus が発現するという本システムの構築は成功したと思われた(Fig.12)。よって Venus 蛍光をマーカーとして、ARIP1 の詳細な発現部位の特定を行うことにした。Venus は、EGFP(Enhanced green fluorescent protein)より数 10 倍強い蛍光強度を持つが、より微弱な蛍光も検出するために、Venus 検出は抗 GFP 抗体を用いた免疫染色により行った。

主にノーザンブロットで mRNA の発現が見られた臓器・組織を中心に行ったが、そのうち免疫染色によって Venus の蛍光が観察されたのは、腎臓、精巣、脳の 3 組織であった。まず腎臓においては、腎小体において最も強い発現が見られ、尿細管においても発現が確認された(Fig.13A)。この事は ARIP1 が腎機能に関与している可能性を示唆している。精巣においては、精母細胞と思われる部分から精子と思われる部分まで、幅広い発現が確認された(Fig.13B)。この事は、ARIP1 が雄の生殖機能に関与している可能性を示唆している。ノーザンブロットでわずかに発現が見られた卵巣や心臓においても観察を行ったが、これら臓器では発現を確認することはできなかった(Fig.13C, D)。

また、ノーザンブロットで最も強い発現が確認され、ARIP1 の重要性が最も

期待される脳での発現解析は、領域ごとに分けて行った。嗅球では最も強い発現が確認されたのは、嗅皮質の中で最も左右間の連絡が発達していると言われる前嗅核領域であった(Fig.14A)。視索前野を含むセクションでは、大脳皮質全体で強い発現が見られた(Fig.14B)。大脳辺縁系では、海馬 CA3 領域が唯一、海馬体外に出力している外側中隔核で発現が見られた(Fig.14C)。また、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌の制御に関わる領域である視索前核の一部や(Fig.14D, E)、アルツハイマーで萎縮が観察されることで知られる無名質でも発現が確認された(Fig.14F)。海馬や視床下部のセクションでは、大脳皮質全体を始め(Fig.14G)、視床下部では脂肪細胞から分泌されるレプチンの刺激を受け、摂食やエネルギー消費を制御する領域として知られる弓状核で(Fig.14H)、扁桃体では、嗅球からの入力を受け、嗅覚とフェロモンの処理に関わる皮質核や(Fig.14I)、情動に関係している基底核でも発現が見られた(Fig.14J, K)。さらには、記憶や空間学習能力に関わる重要な器官である海馬については、成体でもニューロンの新生が行われている歯状回や(Fig.14L)、その歯状回から入力を受けるCA3からCA1領域においても、中程度の発現が観察された(Fig.14M-O)。中脳のセクションでは、上丘と呼ばれる視覚情報の処理に関わる領域の一部で発現が確認された(Fig.14P)。中脳の後半部と橋のセクションでは、下丘と呼ばれる聴覚情報の伝達に関わる領域の一部と(Fig.14Q)、セロトニンニューロンが多く集まる縫線核の一部でも発現が確認された(Fig.14R)。なお、小脳や延髄では強い発現が見られた領域は観察されなかった。

総括

1. ARIP1 によるアクチビン細胞内シグナルの抑制は、Smad3 の核移行阻害によるものであり、そのためには従来必要と思われた、WW ドメインと Smad3、PDZ5 と ActRII の結合はシグナル抑制のためには必ずしも必要ではなく、抑制には ARIP1 の他の領域が関与していることを明らかとした。
2. Exon を cDNA+Venus で置き換えることにより、約 150 万 bp・22exon からなる遺伝子の、1 ステップでのコンディショナル型 KO マウスの作製に成功し、かつ遺伝子の欠損時には Venus ノックイン型となる、新規ジーンターゲットティングシステムを構築した。
3. ARIP1^{+/+}は新生児致死の表現型を示し、その死因は肺の異常によるものである可能性が示唆された。
4. Venus 発現システムにより、ARIP1 遺伝子の発現部位を可視化することに成功した。また、その系を用いて腎臓、精巣、脳における ARIP1 遺伝子の発現領域を特定した。

遺伝子欠損により Venus が発現し、その領域を Venus 蛍光で知る事ができることは、生体の遺伝子発現領域での機能解析を行う系を得た意味を持つ。当研究室ではタモキシフェンの投与により KO が可能となる Cre-ER^{T2} マウスや、Cre 発現 AAV(Adeno-associated virus; アデノ随伴ウイルス)ベクターを脳内の領域特異的にインジェクションするシステムを持っており、これらにより時空間特異的 KO が可能になるとと思われる。今後、ARIP1 の生体内における機能解明に向けての更なる研究の進展が期待される。

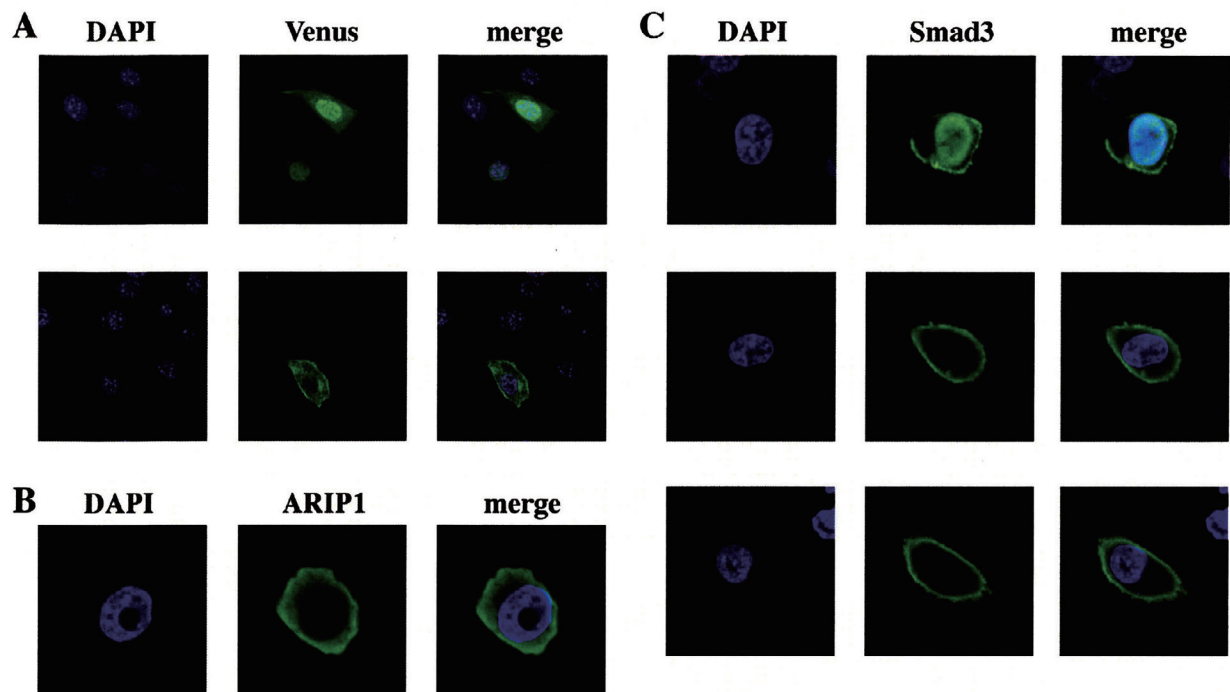


Figure1 Intracellular localization of ARIP. (A) NIH3T3 cells were transfected with pcDNA3-Venus (upper panel) or pcDNA3-Venus-ARIP1 (lower panel). ARIP was mainly localized to the cytomembrane. (B) CHO cells were transfected with pcDNA3-ARIP1(ΔPDZ5). (C) CHO cells were transfected with pFLAG-Smad3 only (upper panel), pFLAG-Smad3 and pcDNA-ARIP1 (middle panel), pFLAG-Smad3 and pcDNA-ARIP1(ΔWW). DAPI stained nuclei were blue.

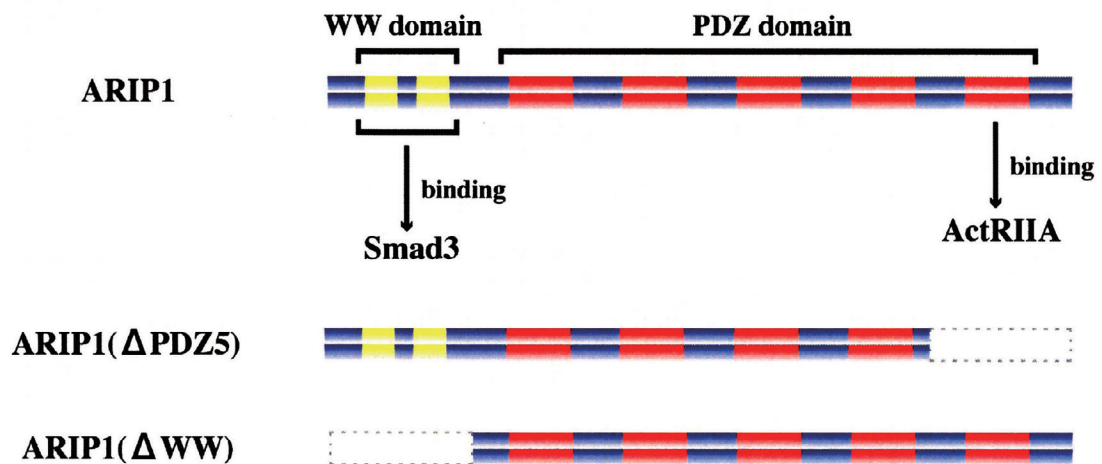


Figure2 Structure of ARIP1 deletion mutants. ARIP1-short has two WW domains and five PDZ domains. WW domains bind Smad3, and fifth PDZ domain binds ActRIIA.

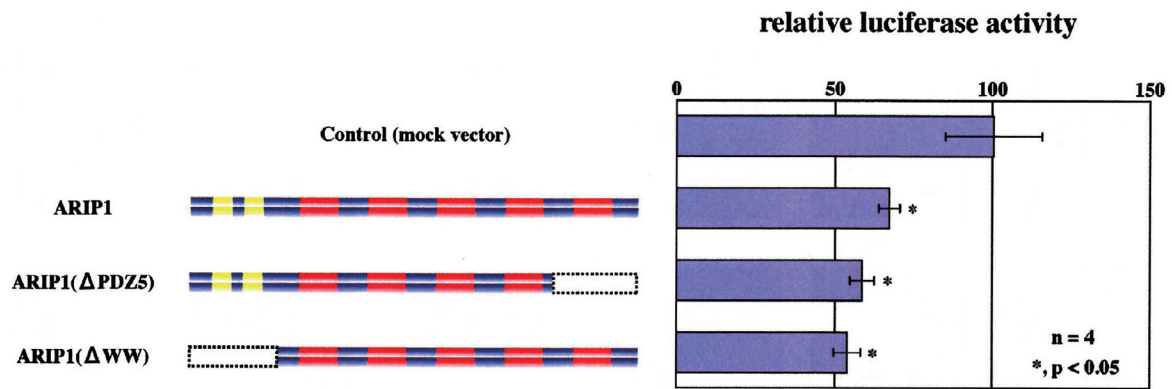


Figure3 Effects of various ARIP1 mutants on activin-induced transcription. All of ARIP1s inhibit activin-induced transcription in CHO-K1 cells. CHO-K1 cells were transfected with 3TP-lux, pCH110, and various ARIP1s and incubated for 36 hours. After 36 hours, CHO-K1 cells were incubated with 50ng/ml Activin A for 12 hours. The luciferase activity of each lysate was measured and normalized to the β -galactosidase activity. All ARIP1s inhibit activin-induced transcription in CHO-K1 cells.

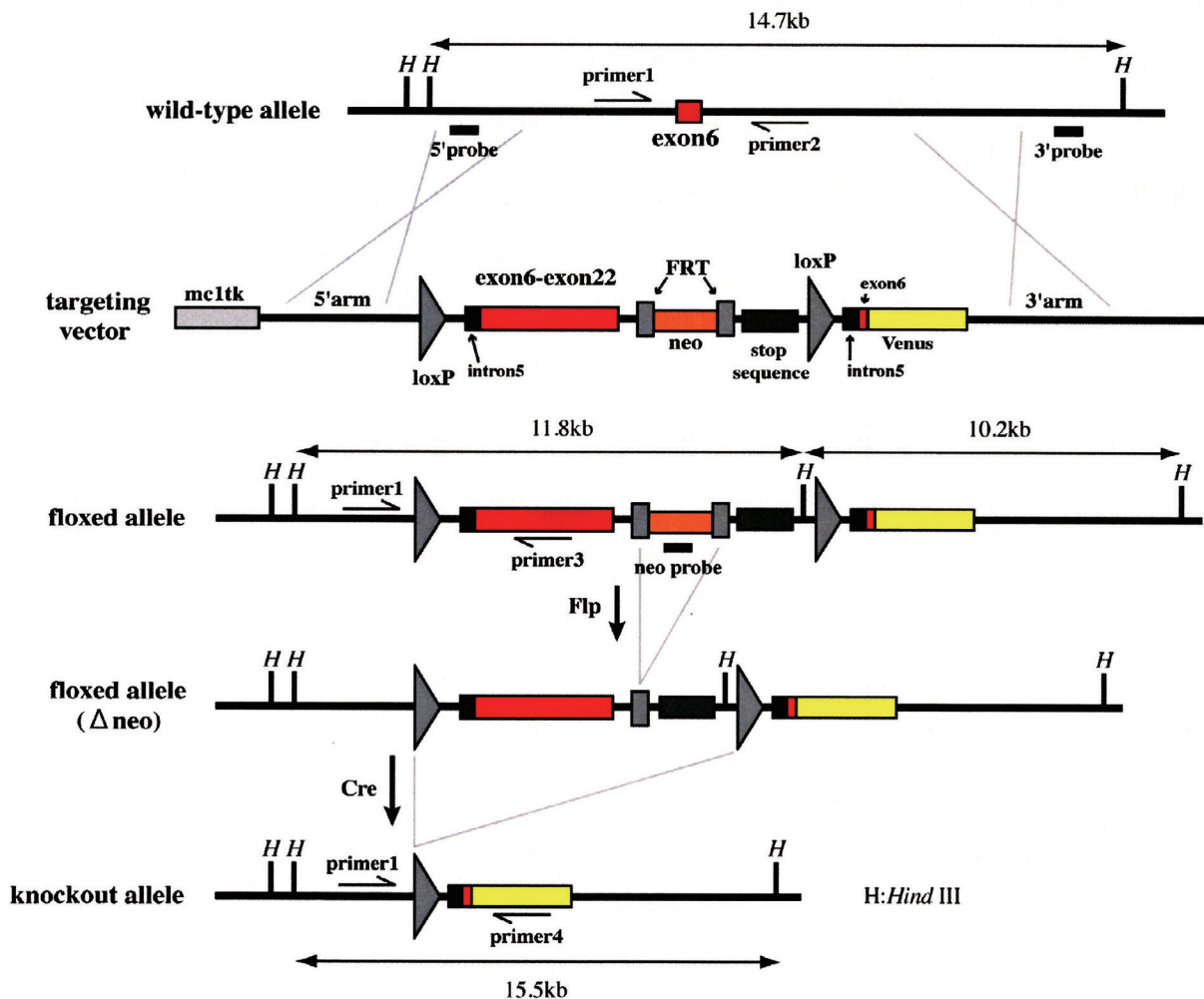


Figure4 Generation of ARIP1 KO mice. The wild-type and mutant *ARIP1* loci and gene targeting constructs. Exon and the ARIP1 cDNA are indicated by red box. Stop sequence and Venus cDNA are indicated by yellow box and dark gray box, respectively. Triangles and oblongs are *loxP* and FRT sites, respectively. Position of restriction enzyme sites and the probes used for Southern blot analysis are shown (H; Hind III).

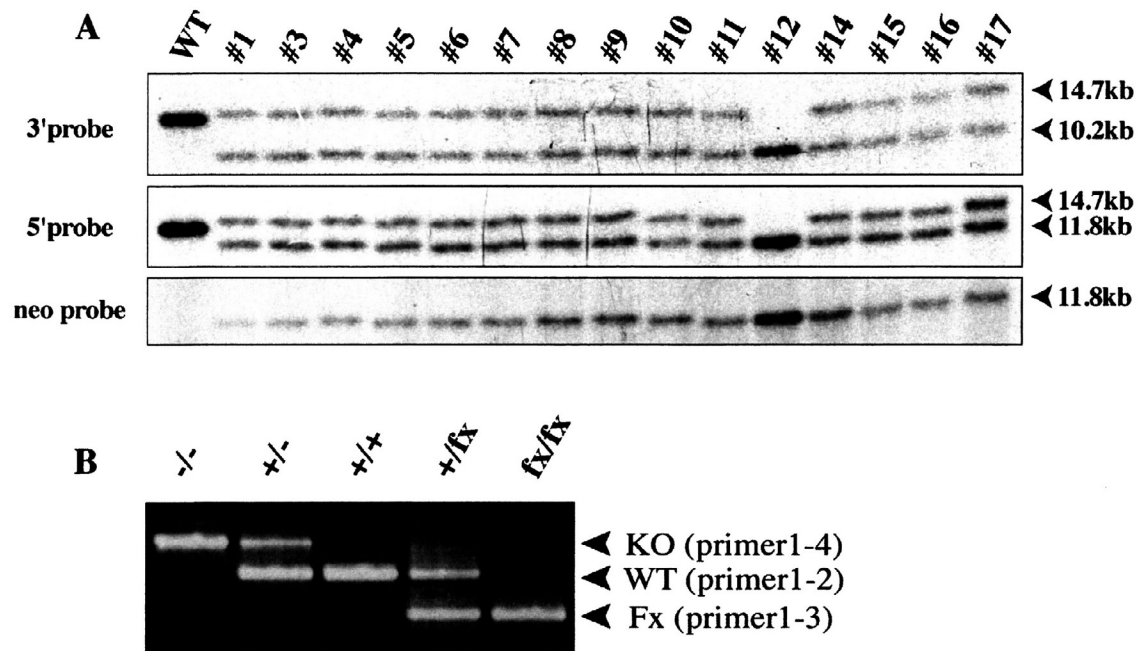


Figure5 Genotyping of ARIP1 ES clones and ARIP1 KO mice. (A) Southern blot analysis of genomic DNA from ARIP1 ES clones. *Hind* III-digested ES DNA was hybridized with the radiolabeled probes indicated in Fig. 4. (B) PCR analysis of genomic DNAs from the tail of f1 offsprings derived from the chimeric mice. PCR primers are indicated in Fig. 4.

Table1 Number of newborn and weaned pups.

♂ +/- × ♀ +/-

genotype	+/+	+/-	-/-	total
number (P0)	30	51	30	111
ratio	1	1.70	1	—
number (weaned)	61	122	0	183
ratio	1	2.10	0	—

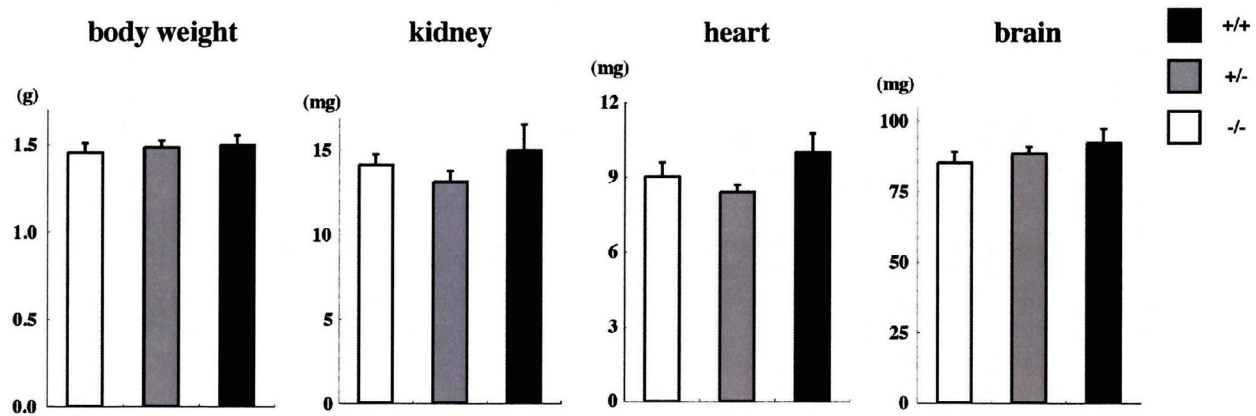


Figure6 Body weight and organ weights in P0 ARIP1^{+/+}, ARIP1^{+/-} and ARIP1^{-/-} mice.

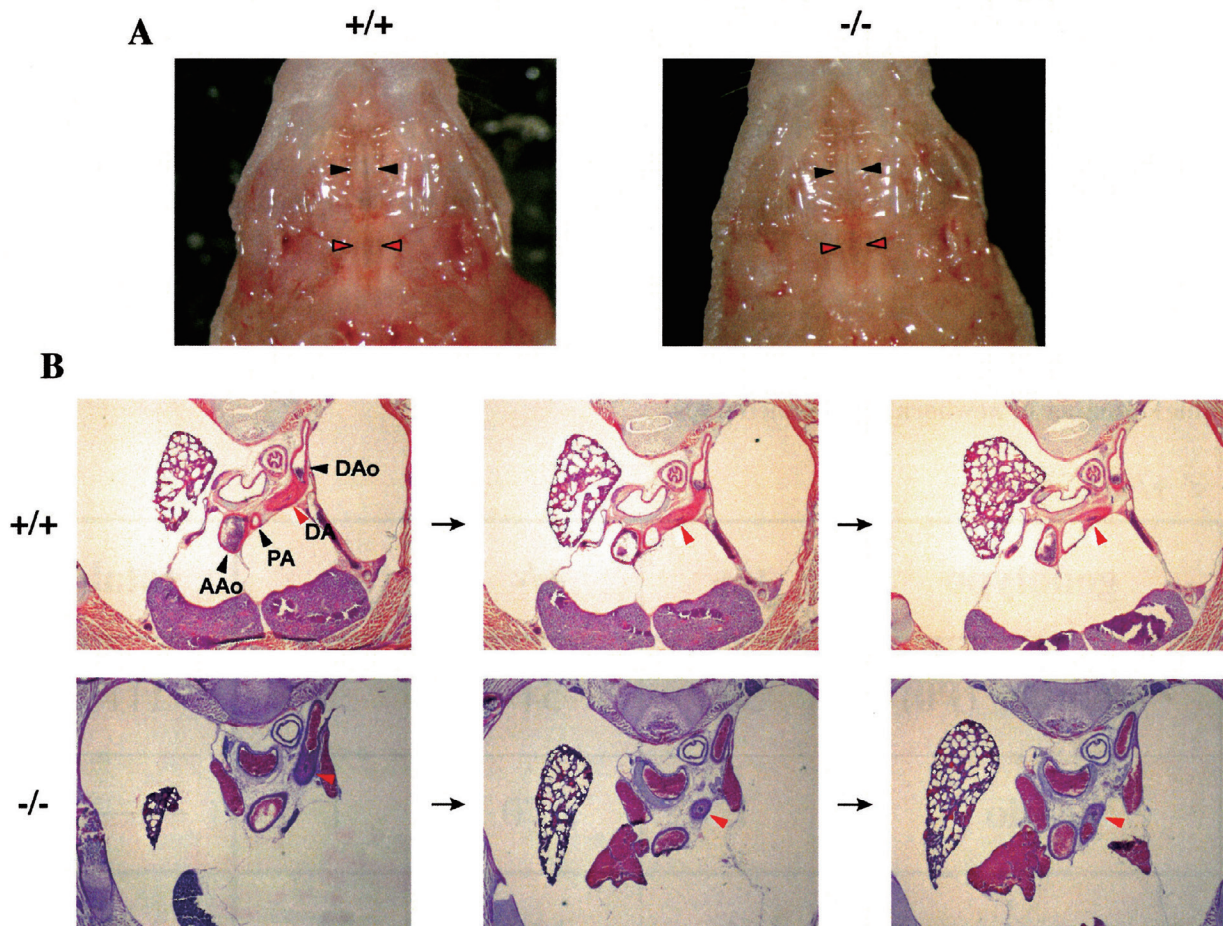


Figure7 Leathal analysis of P0 ARIP1^{-/-} mice. (A) Palate of ARIP1^{+/+} mouse and ARIP1^{-/-} mouse. Black arrow heads indicate hard palate. Red arrow heads indicate soft palate. (B) Serial HE-stained section cut at the level of the DA of a P0 ARIP1^{+/+} mouse (upper panel) and ARIP1^{-/-} mouse (lower panel). AAO, ascending aorta; DA, ductus arteriosus; PA, pulmonary artery; DAo, descending aorta.

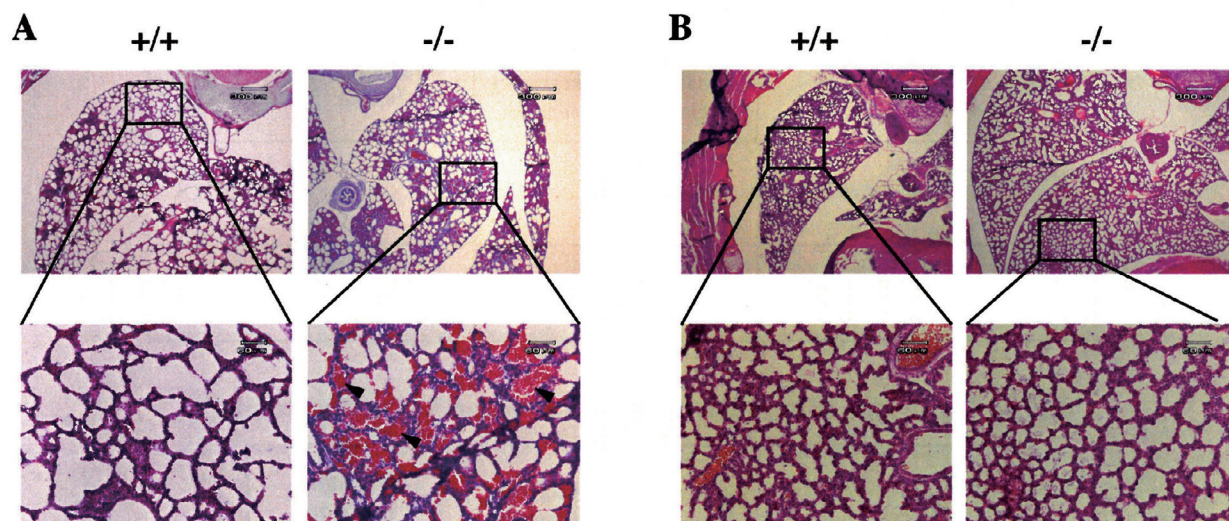


Figure8 Histological analysis of P0 and E19.0 lungs. Morphology of P0 $ARIP1^{-/-}$ alveoli show abnormality (A). But E19.0 $ARIP1^{-/-}$ have normal alveoli (B). Arrow heads indicate bleeding into the alveolar spaces.

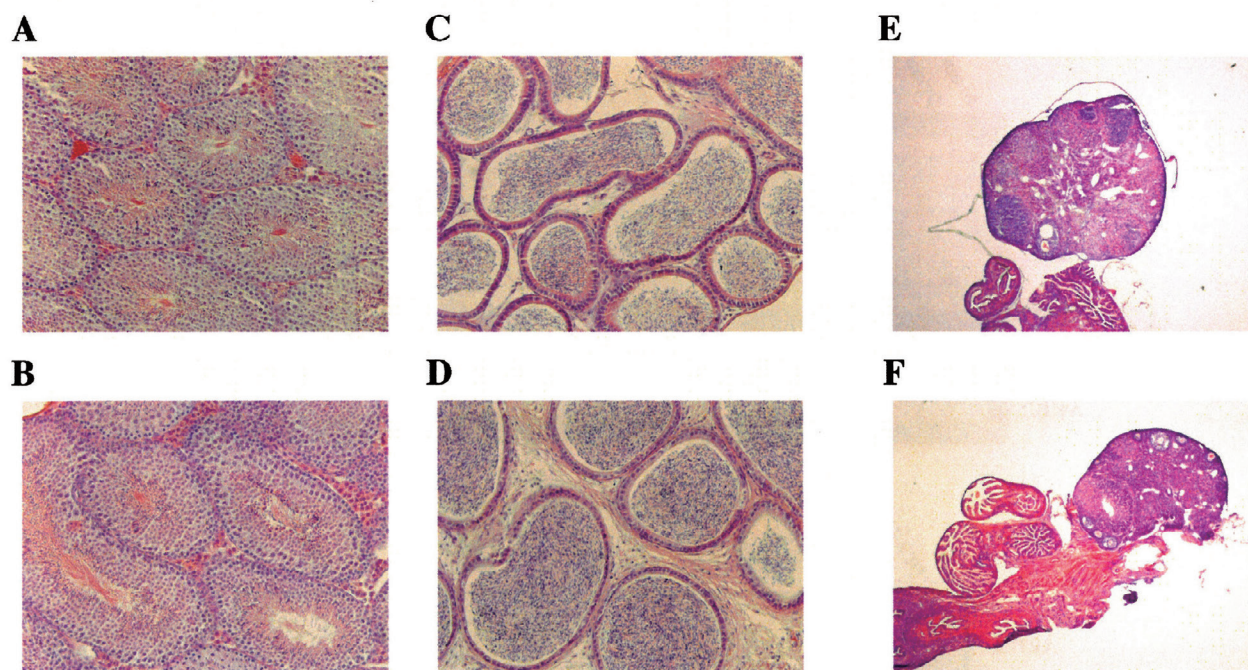


Figure9 Histological analysis of adult testis, epididymis and ovary. Histological analysis of testis (A, B), epididymis (C, D) or ovary (E, F) of $ARIP1^{+/+}$ (E), $ARIP1^{+/fx}; Amhr2-Cre^{+/-}$ (A, C) and $ARIP1^{-/fx}; Amhr2-Cre^{+/-}$ (B, D, F). The sections were stained with HE.

Table2 The profile of reproductive functions of fertility in male mice.

♂	×	♀	No. of mating trials	No. of pregnancy female	Pregnancy rate (%)	Average litter size
ARIP1 +/fx; Amhr2-Cre +/-	×	C57BL/6J	32	6	18.8	7.2±0.8
ARIP1 -/fx; Amhr2-Cre +/-	×	C57BL/6J	54	8	14.8	5.9±0.6

Table3 The profile of reproductive functions of fertility in female mice.

♂	×	♀	Average litter size	Postnatal survivors (%)
C57BL/6J	×	ARIP1 +/fx; Amhr2-Cre +/-	7.0±1.5	95
C57BL/6J	×	ARIP1 -/fx; Amhr2-Cre +/-	6.7±1.9	95

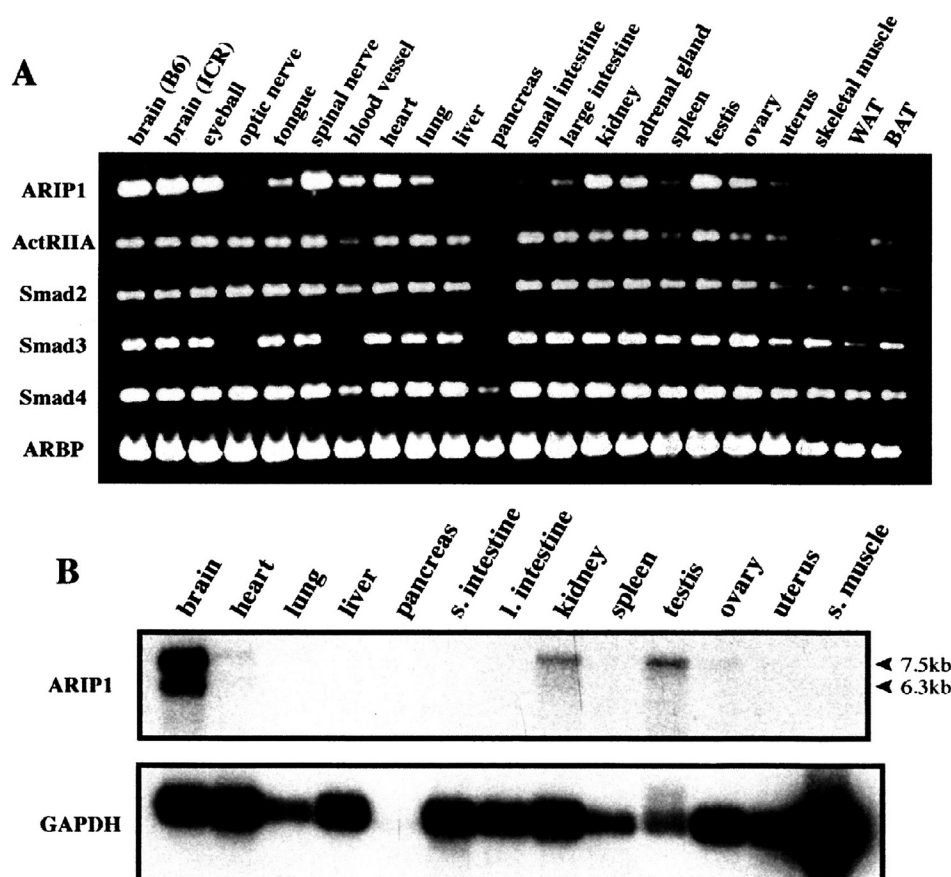


Figure10 Tissue distribution of ARIP1 and activin signaling factors mRNA. (A) mRNAs isolated from various mice tissues were detected by RT-PCR analysis (A) and Northern blot analysis (B).

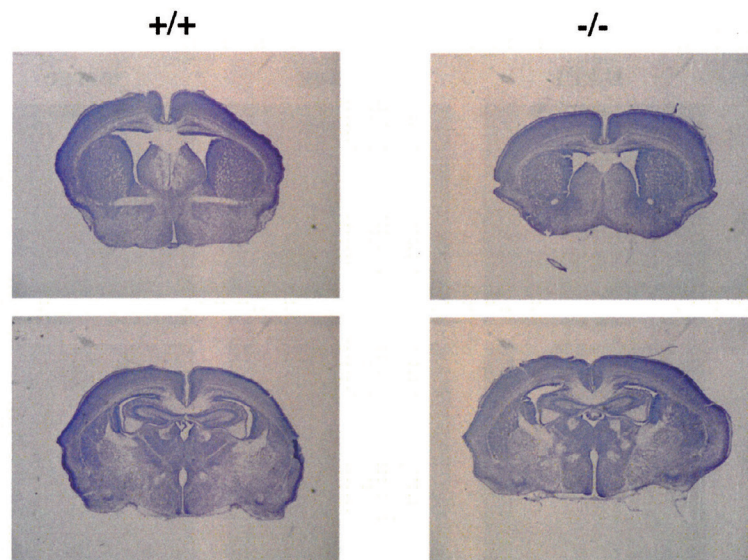


Figure11 Histological analysis by cresyl violet staining of the ARIP1^{+/+} and ARIP1^{-/-} brain.

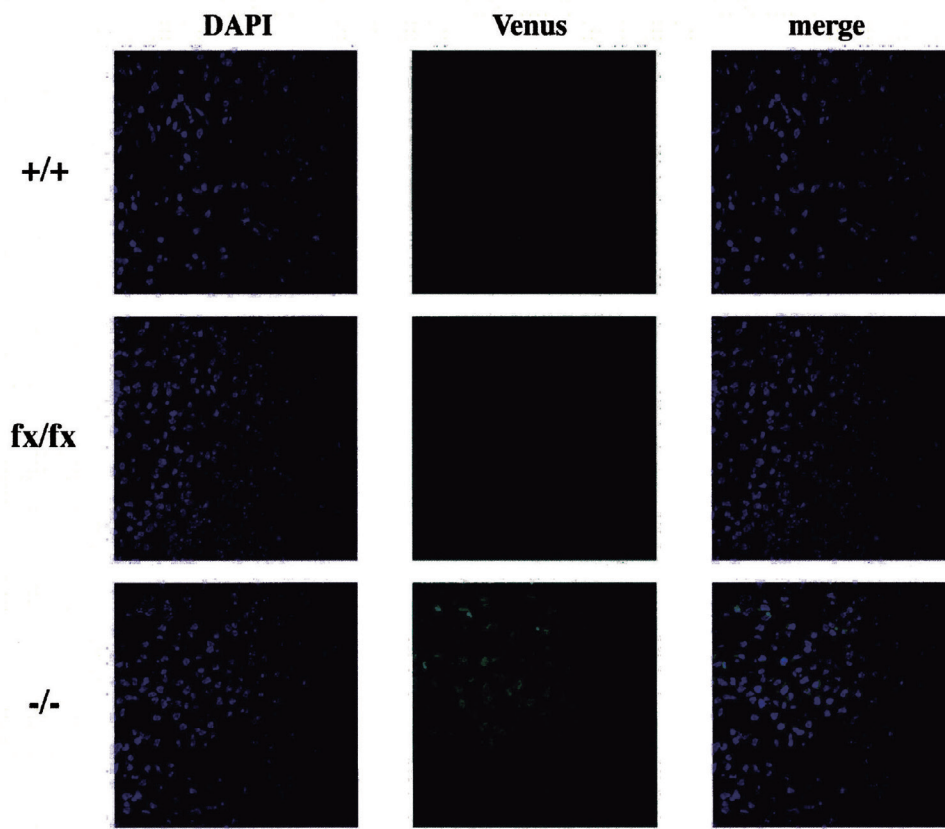


Figure12 Venus expression in brain from P0 mice. Brain tissue section from ARIP1^{+/+} mouse (upper panel), ARIP1^{fx/fx} mouse (middle panel) and ARIP1^{-/-} mouse (lower panel). Mice were visualized for green fluorescence of Venus protein, expressed under the control of ARIP1 gene. DAPI stained nuclei were blue.

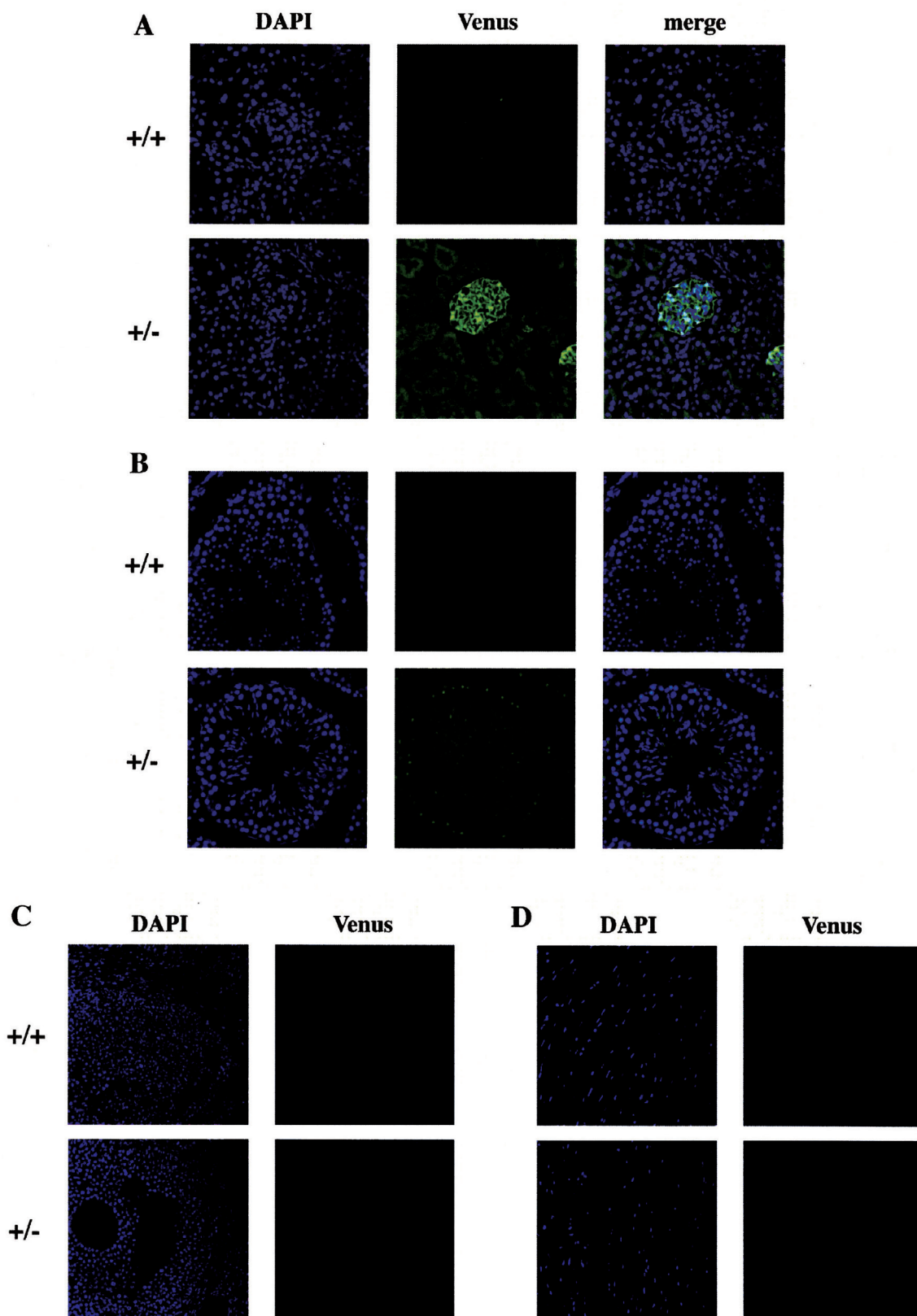


Figure13 Immunocytochemical detection of Venus protein by using anti-GFP antibody. Venus immunoreactivity were observed in kidney (A) and testis (B), but not ovary (C) and heart (D).

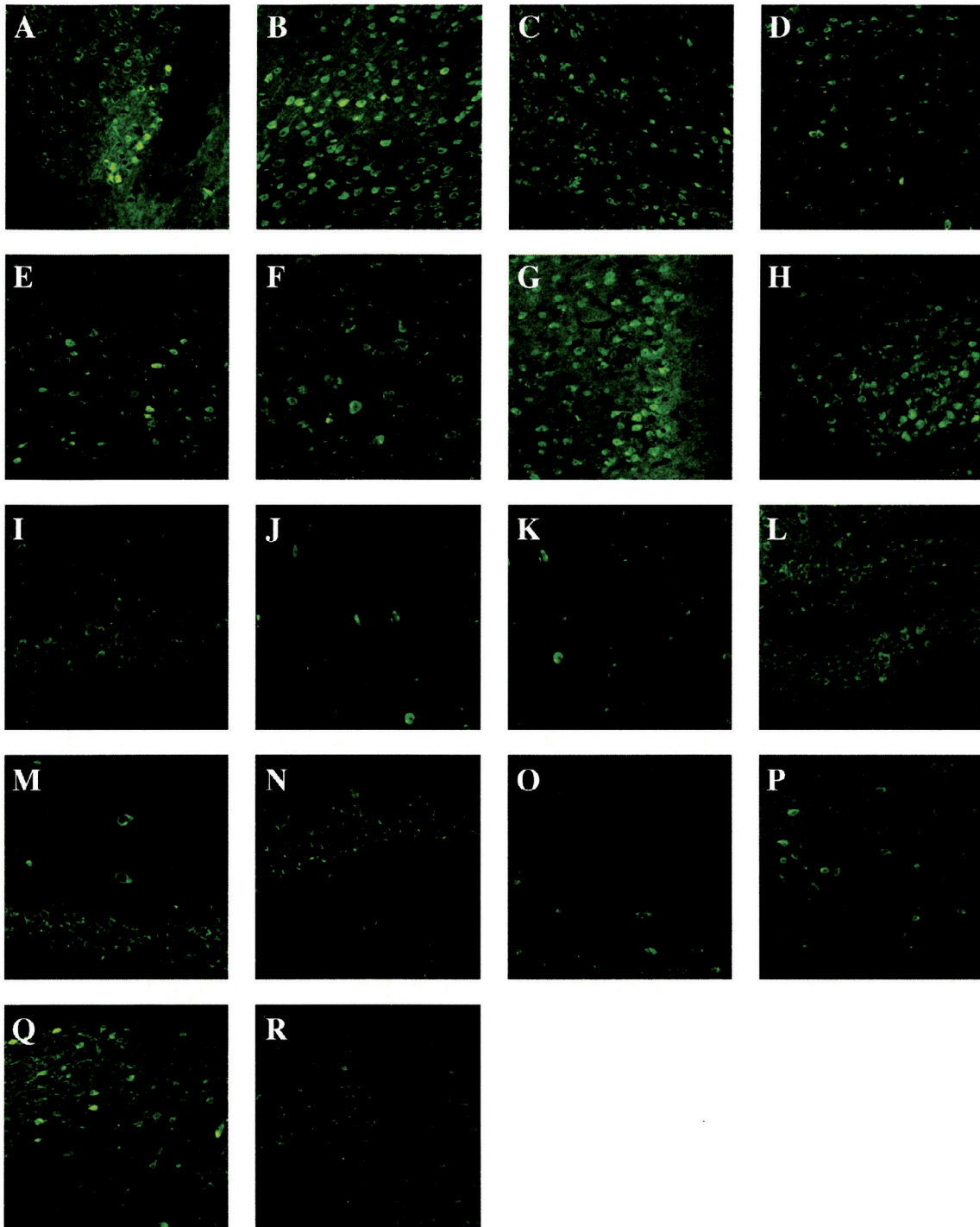


Figure14 The distribution of Venus-immunoreactivity in the brain of ARIP1^{+/-} mice.

Immunoreactive cells for Venus were found in AOL (A), Cg1 (B), LSV (C), ADP (D), LPO (E), SI (F), RSG (G), Arc (H), PLCo (I), BLA (J), BMP (K), PoDG (L), CA1 (M), CA2 (N), CA3 (O), SuG (P), DCIC (Q) and RC (R). AOL, anterior olfactory nucleus, lateral part; Cg1, cingulate cortex, area 1; LSV, lateral septal nucleus, ventral part; ADP, anterodorsal preoptic nucleus; LPO, lateral preoptic area; SI, substantia innominata; RSG, retrosplenial granular cortex; Arc, arcuate hypothalamic nucleus; PLCo, posterolateral cortical amygdaloid nucleus; BLA, basolateral amygdaloid nucleus, anterior part; BMP, basomedial amygdaloid nucleus, anterior part; PoDG, polymorph layer of the dentate gyrus; field CA1 of hippocampus; SuG, superficial gray layer of the superior colliculus; DCIC, dorsal cortex of the inferior colliculus; RC, raphe cap.

論文審査結果要旨

伊原寛一郎は、多エクソンの長大なマウス遺伝子を対象に、cDNA置き換えという果敢な、且つ過去に例を見ない独自性に溢れる方法で、1ステップで条件型 (conditional) 欠損マウスを作製し、その解析により、アクチビンのシグナル調節分子とされるArip1(S-Scam)の生体調節機能の解明に大きな道筋を付け、これを博士論文としてまとめ学位審査最終試験に臨んだ。

発表では、まず発生や生殖、生体制御機構など生体内で多彩な機能の予想されるArip1蛋白の各領域とアクチビンシグナル抑制制御機能との関連をin vitro実験により解析した結果を説明した。抑制に関与する分子内領域同定のため、そのPDZ、又はWW領域を欠損した変異体がアクチビンシグナルに及ぼす影響を、アクチビン応答性配列に依るレポーター系で計測した。その結果、野生型のArip1も、また作製した変異体もアクチビンシグナルを抑制し、PDZ、WW領域以外の領域がアクチビンシグナル抑制に関わることを見出した。またArip1との共発現によりシグナル伝達分子Smad3の核局在が阻害され、シグナル抑制がSmad3の核移行阻害による可能性を見出した。

続いてknockinマウスの作製と解析について述べられた。作製したArip1条件型 (conditional) KOマウスは、遺伝子欠損により当該遺伝子の生体や細胞での機能が解析でき、遺伝子欠損に伴い蛍光マーカーVenusが発現してArip1の発現器官・組織がモニターできる、など多用途ツールである。Arip1のN末端までを含むサブタイプの遺伝子KOマウスは既に報告されているが、これによれば、このKOマウスは新生児致死とニューロン樹状突起のspine (棘; シナプスから情報を受け学習記憶等に関与する) の異常を示した。伊原は条件型 (conditional) マウス作製によるより詳細な解析を求め、新規遺伝子KOシステムによりこれを完成した。即ち標的Arip1遺伝子のexon6から最終exonであるexon22までを単一cDNAに置き換え、その手前にloxP配列を置き、下流に転写終了配列を配置した。その下流にloxP配列と、強化型蛍光タンパク質(Venus)を組み込んだ。本マウスは通常野生型と同様Arip1を発現し個体は健康でありVenusは発現しない。CreによりloxP領域が欠損すると、Arip1は欠損しVenusが発現、本来のArip1発現部位は容易に可視化される。作出されたヌルマウス (Arip1^{-/-}) はメンデルの法則に従って出生し、外見は正常だが新生児致死を示した。新生児致死の原因とされる口蓋裂、動脈管開存症は認められなかった。肺胞では血液滞留が見られ、致死との関連が疑われた。

さらにArip1-Venus発現システムによりArip1の発現部位を解析したところ、ノーザン解析によりmRNAの検出された腎臓、精巣、脳において強いVenus発現(免疫染色)が確認された。腎糸球体での強い、尿細管でのやや弱い発現、精巣精原細胞、もしくは精母細胞から精子細胞への分化過程での幅広い発現、脳嗅球から中脳に渡る多くの領域での強い発現等が確認された。この結果は、伊原の作製したマウスがArip1発現や組織・器官での発現解析など、多彩な目的に合致した有力なツールであることを示した。この発表を通じ、伊原寛一郎の研究は博士学位授与に相当することが、審査員全員により認められた。